



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
VLIR-Network Ecuador

Maestría en Biociencias Aplicadas con Mención en
Biodescubrimiento

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE DESARROLLO DE
***HYPERICUM LARICIFOLIUM* SOBRE METABOLITOS**
RESPONSABLES DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
UTILIZANDO FINGERPRINT CROMATOGRÁFICO

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de
Magíster en Biociencias Aplicadas con Mención en
Biodescubrimiento

AUTOR: Rodrigo José Tenesaca Sigua CI.: 1400561096

TUTOR: Fabián León-Tamariz CI.: 0102311610

Cuenca, Ecuador

2017

RESUMEN

El principal objetivo de este estudio fue investigar la influencia de las fases de desarrollo de *Hypericum laricifolium* sobre los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) utilizando la metodología de Fingerprint cromatográfico. Un método de HPLC-DAD se desarrolló para separar los componentes presentes en las muestras de *H. laricifolium* mediante la optimización de las condiciones cromatográficas utilizando un diseño factorial 2^3 . Se utilizó el método de mínimos cuadrados parciales, conocido por sus siglas en inglés PLS, (partial least squares) para establecer una correlación entre la actividad antibacteriana y los perfiles cromatográficos de los extractos de *H. laricifolium* a 254, 280 y 360 nm. Se construyó un modelo utilizando 30 muestras con 7501 variables (X) correspondientes a las respuestas obtenidas en el espectro UV en diferentes tiempos; las variables (Y) consistió en valores experimentales de concentración inhibitoria media (CI50) de cada extracto. Previo al análisis por PLS, los cromatogramas fueron sometidos a un pretratamiento por centrado de columnas. El modelo PLS fue aprobado por validación cruzada; su capacidad se evaluó utilizando los parámetros de correlación (R^2) y la raíz del error medio cuadrático de predicción (REMCP). Los mejores resultados se lograron con el cromatograma a 254 nm ($R^2 = 0.90$, REMCP = 2.25). En estas condiciones, el número de componentes óptimo (NCO) fue ocho. Finalmente, la prueba T de Student no mostró una diferencia significativa entre las actividades antibacterianas de los estadios joven y adulto de *H. laricifolium*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, Estadio de desarrollo vegetal, Fingerprint cromatográfico, *Hypericum laricifolium*, Mínimos cuadrados parciales.

ABSTRACT

The main objective of this study was to investigate the influence of the development phases of *Hypericum laricifolium* on metabolites responsible for the antibacterial activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using Chromatographic Fingerprint as methodology for modeling. An HPLC-DAD method was developed to separate the components present in *H. laricifolium* extracts by optimizing the chromatographic conditions, using a factorial design 2^3 . The partial least squares (PLS) method was used to establish a correlation between the antibacterial activity and the chromatographic profiles of *H. laricifolium* extracts at 254, 280 and 360 nm. A model was constructed using 30 samples with 7501 X variables corresponding to the responses obtained in the UV spectrum at different times; the Y variables consisted of experimental values of inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of each extract. Prior to the PLS analysis, the chromatograms were subjected to a pre-treatment of column centering. The PLS model was validated by cross validation; their capacity was evaluated using the correlation parameters (R^2) and the root mean square error prediction (RMSEP). The best results were achieved with the 254 nm chromatogram ($R^2 = 0.90$, RMSEP = 2.25). Under these conditions, the optimal number of components was eight. Finally, the Student's T test did not show a significant difference between the antibacterial activities of the young and adult stages of *H. laricifolium*.

Keywords: Antibacterial activity, Chromatographic fingerprint, *Hypericum laricifolium*, Partial least squares, Plant development stage.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	11
2. Materiales y métodos.....	12
2.1 Instrumentación.....	12
2.2 Reactivos.....	12
2.3 Análisis de datos.....	12
2.4 Recolección del material vegetal.....	12
2.5 Tratamiento de las muestras vegetales.....	13
2.6 Identificación molecular de <i>Hypericum laricifolium</i> basado en secuencias de códigos de barras de ADN, rDNA-ITS, rDNA-ITS2 y rbcl.....	13
2.7 Extracción por fluidos supercríticos (EFS).....	14
2.7.1 Condiciones de operación y procedimiento de EFS.....	14
2.7.2 Preparación de extractos.....	14
2.8 Determinación de la Concentración inhibitoria media (CI50).....	15
2.9 Optimización de las condiciones cromatográficas.....	15
2.9.1 Preparación de extractos.....	15
2.9.2 Establecimiento de la variable respuesta y factores.....	15
2.9.3 Condiciones de optimización.....	16
2.9.4 Optimización de gradiente.....	16
2.9.5 Pretratamiento de los datos cromatográficos.....	16
2.9.6 Correlación entre la actividad antibacteriana y los perfiles cromatográficos.....	17
3. Resultados y discusión.....	17
3.1 Identificación molecular de <i>Hypericum laricifolium</i>	17
3.2 Determinación de la CI50.....	18
3.3 Optimización de las condiciones cromatográficas.....	18
3.4 Obtención del modelo predictivo.....	20
4. Conclusión.....	21
Anexos.....	22
Referencias.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lugares de recolección de <i>Hypericum laricifolium</i>	13
Tabla 2. Características de secuencias de cebadores utilizados.....	14
Tabla 3. Factores y niveles del diseño factorial.....	16
Tabla 4. Secuencias que producen alineaciones significativas.....	17
Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos lipofílicos sobre SARM.....	18
Tabla 6. Resultados comparativos de los modelos de predicción PLS.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatogramas optimizados de muestras de <i>H. laricifolium</i> en tres Longitudes de onda diferentes. (a) 254 nm, (b) 280 nm, y (c) 360 nm.....	19
Figura 2. Correlación entre la actividad antibacteriana experimental y ajustada para las muestras utilizadas para los perfiles cromatográficos de 254 nm (a) y 280 nm (b).....	20

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Rodrigo José Tenesaca Sigua en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del estado de desarrollo de *Hypericum laricifolium* sobre metabolitos responsables de actividad antibacteriana utilizando fingerprint cromatográfico", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de Diciembre de 2017



Rodrigo José Tenesaca Sigua

1400561096

Cláusula de Propiedad Intelectual

Rodrigo José Tenesaca Sigua, autor/a del trabajo de titulación "Evaluación del estado de desarrollo de *Hypericum laricifolium* sobre metabolitos responsables de actividad antibacteriana utilizando fingerprint cromatográfico", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 20 de Diciembre de 2017



Rodrigo José Tenesaca Sigua

1400561096

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la red Vlr Network Ecuador por su ayuda brindada en la disposicion de laboratorios y equipos. Un agradecimiento a los técnicos de dicha institución. Agradezco también la ayuda de mi director, co-tutor y asesor de tesis por su acertada orientación en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y a todas esas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a que este trabajo llegue a realizarse.

Evaluación del estado de desarrollo de *Hypericum laricifolium* sobre metabolitos responsables de actividad antibacteriana utilizando fingerprint cromatográfico

Rodrigo Tenesaca¹, Efrén Santos², Lourdes Jerves-Andrade¹, Johana Ortiz¹, Fabián León-Tamariz¹

¹ Departamento de Biociencias; Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad de Cuenca, rodrigo.tenesaca@ucuenca.ec

² Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía
Perimetral,
Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL

1. Introducción

Hypericum laricifolium Juss es un arbusto esclerófilo que pertenece a la familia Guttiferae, cuya área de distribución comprende desde el oeste de Venezuela hasta el norte de Perú (Crockett, Eberhardt, Kunert, & Schühly, 2010; Robson, 1990). Varias propiedades medicinales se atribuyen a esta planta. Así, en la medicina tradicional de estos países, *H. laricifolium* es reconocido por su actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica (Bussmann et al., 2010), y por su eficacia en el tratamiento de afecciones gastrointestinales (Ansaloni et al., 2010). La infusión de esta planta se usa tradicionalmente como tranquilizante, para tratar resfríos y para dolores postparto (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009).

En diversos estudios, varias especies de *Hypericum* han mostrado actividad antibacteriana sobre SAMR (Bussmann et al., 2010; Gibbons, Ohlendorf, & Johnsen, 2002; Saddique, Naeem, & Maimoona, 2010). La actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas ha sido observada y atribuida a la hiperforina, el principal acilfloroglucinol aislado en el género *Hypericum* (Bussmann et al., 2010). Además, se ha informado acerca de la acción de la quercetina y la rutina contra *S. aureus*; estos compuestos flavonoides comúnmente encontrados en el género *Hypericum* son bien conocidos por su actividad antibacteriana (Ragunathan & Ravi, 2015). En cuanto a la especie *H. laricifolium* seleccionada para el presente trabajo, existen reportes que destacan su potencial como agente antibacteriano sobre SARM (Bussmann et al., 2011; Jerves-Andrade et al., 2014; Tistaert, Dejaegher, & Heyden, 2011), así como el aislamiento e identificación de derivados adicionales de acilfloroglucinol encontrados en el extracto de n-hexano de una ascensión venezolana de *H. laricifolium* (Ccana-Ccapatinta & von Poser, 2015).

Son diversos los estudios realizados en especies del género *Hypericum* en las que se ha determinado el contenido de sustancias bioactivas antibacterianas en diferentes etapas de desarrollo (vegetativo, floración y fructificación). Así, en *H. brasiliense* e *H. organifolium* se determinó que los compuestos acilfloroglucinol, rutina y quercetina estuvieron presentes en concentraciones más altas durante la fase de floración (Abreu, Porto, Marsaioli, & Mazzafera, 2004; Çirak, Radušienė, Ivanauskas, & Janulis, 2007). En otro estudio llevado a cabo en *H. pruinatum* e *H. triquetrifolium* se estableció que el contenido de los flavonoides: quercetina y rutina aumentaron durante la fenología de la planta, sugiriendo así que la planta debe ser cosechada durante la floración para fines medicinales (Çirak, Radusiene, Ivanauskas, Jakstas, & Çamaş, 2014; Çirak, Radusiene, Kapraviciene, Çamaş, & Odabaş, 2013). Sin embargo, hasta donde se sabe ningún estudio acerca de la influencia de las fases de desarrollo de *H. laricifolium* sobre la actividad

antibacteriana frente a SAMR utilizando la metodología de Fingerprint cromatográfico ha sido realizado.

En los últimos años, la técnica de perfiles cromatográficos ha desempeñado un papel importante en el control de calidad de la medicina herbaria (Gong, Wang, Chau, & Liang, 2005), y estudios de metabolómica y proteómica (Andersson, Kaiser, & Jacobsson, 2004; Daszykowski et al., 2007). Si bien el análisis de perfiles cromatográficos permite el análisis químico de matrices complejas, estos se pueden correlacionar de alguna manera con la actividad biológica del material curativo. Con el objetivo de correlacionar la actividad biológica de la medicina herbaria y su huella digital, pueden usarse diferentes técnicas de regresión multivariante como los mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión de componentes principales (PCR). El modelo ajustado puede utilizarse para describir la relación entre las dos variables o para predecir nuevas variables (Camo, 1996). Con estos antecedentes, el principal objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del estadio de la planta sobre la actividad antibacteriana en extractos lipofílicos de *H. laricifolium* utilizando fingerprint cromatográfico.

2. Materiales y métodos

2.1 Instrumentación

La optimización de las condiciones cromatográficas se realizó utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent Serie 1200, Santa Clara, EE.UU) con un detector de arreglo de diodos (DAD) (G1315D). La separación cromatográfica se realizó a través de una columna monolítica C18 (100×4.6mm) (Chromolith® Merck, Darmstadt, Alemania).

El dispositivo utilizado en el proceso de extracción fue un equipo de extracción de fluidos supercríticos (FSC) (Waters Corporation, Milford, EE.UU).

2.2 Reactivos

Etanol absoluto para análisis y el dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) para la extracción de FSC. El dióxido de carbono se adquirió de Indura S.A (Guayaquil, Ecuador). Acetonitrilo, metanol, ácido acético glacial y ácido fosfórico concentrado para el análisis HPLC fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El agua utilizada como fase móvil cromatográfica se purificó en un sistema MilliQ Millipore (Madrid, España).

2.3 Análisis de datos

La herramienta de software matemático MATLAB 9.0 (The MathWorks, Inc., USA) fue utilizada para construir el modelo quimiométrico, la determinación de los valores atípicos y para establecer la diferencia significativa entre las medias de CI50 de los estadios de *H. laricifolium* mediante la prueba T de Student, con un nivel de significancia del 5%.

2.4 Recolección del material vegetal

Las muestras de *H. laricifolium* fueron seleccionados mediante un muestreo no probabilístico o dirigido debido a las características específicas de muestreo (estadio joven y adulto) (Roberto, Collado, & Lucio, 2010). Se recolectaron 15 muestras de *H. laricifolium* en estado de desarrollo adulto y 15 muestras en estado de desarrollo joven

(brotes) en las provincias de Azuay y Cañar. Las plantas en estado de floración fueron clasificadas como pertenecientes a la etapa de desarrollo adulta y los brotes adyacentes a estas plantas fueron consideradas como pertenecientes a la etapa de desarrollo joven y se identificó la altitud y coordenadas del lugar de recolección (Tabla 1).

Tabla 1. Lugares de Recolección de *Hypericum laricifolium*.

Ubicación	Altura (msnm)	Coordenadas (x;y)
Parque de Aguarongo-Azuay	3160	2°56'12''; 78°50'50''
Granja U. de Cuenca-Azuay	3140	2°57'52''; 79°6'46''
Vía Cumbe-Loja- Azuay	3416	3°11'63''; 79°1'62''
Vía Biblián-Cañar- Cañar	3484	2°37'30''; 78°54'54''

2.5 Tratamiento de las muestras vegetales

El tratamiento de las muestras de *H. laricifolium* inició con la selección de hojas y tallos sin muestras de alteración, seguido del lavado para eliminar materiales extraños, inmersión en agua destilada para eliminar sales contenidas en el agua potable, secado al ambiente por 24 horas, secado en estufa (Pro 3, Cuenca, Ecuador) a temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta obtener un peso constante. Finalmente el material vegetal fue colocado en fundas de papel y se almacenó en estantes libres de contacto de polvo y humedad hasta posterior extracción (Guillén Mena & Sarmiento Berrezueta, 2011; Organization, 2003).

2.6 Identificación molecular de *Hypericum laricifolium* basado en secuencias de códigos de barras de ADN, rDNA-ITS, rDNA-ITS2 y rbcL

Una muestra (brotes) de cada lugar de recolección del material vegetal recolectado se tomó para la identificación genética.

Se utilizaron 100 mg de hojas frescas de *H. laricifolium*. Las muestras se introdujeron en envases de polietileno y se sumergieron en nitrógeno líquido para su posterior extracción. Todo el material empleado en la manipulación del material vegetal se mantuvo en condiciones frías (nitrógeno líquido) para optimizar el proceso. En el pesaje y molienda se empleó una balanza analítica (Thomas Scientific, Swedesboro, EE.UU) y un molino de bolas (RESTCH, Haan, Alemania) programado a 25 frecuencias por segundo durante dos lapsos de tiempo de 30 segundos. Para la extracción del ADN genómico se siguió el método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Querci, Jermini, & Eede, 2006) con modificaciones establecidas por el Laboratorio de Biología Molecular del CIBE-ESPOL. En el proceso se empleó una incubadora (Thermo Scientific B15), centrífuga refrigerada (Thermoscientific 5T 16R), estufa (Memmer BM-400) y un concentrador (VACUFUGE plus/concentrador plus) todos ellos de procedencia estadounidense (Waltham, EEUU). En la cuantificación del ADN genómico se utilizó un espectrofotómetro (Biotek Sinergy HT, Winooski, EE.UU) adaptado a un software para análisis de datos Gen5™. Se trabajó con 2 µL de muestra, depositados en pocillos de placa TAKE3 disponibles para su medición. Las lecturas de las absorbancias se realizaron a 260 y 280 nm.

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se realizó en un Termociclador (Eppendorf, Nueva York, EE.UU) utilizándose 1 µL del ADN aislado y cuantificado de cada muestra, 0.25 µL de cebadores seleccionados (Tabla 2), 3.5 µL de agua y 5 µL de la polimerasa Green Go Taq Promega. La separación de las moléculas se realizó en un equipo de electroforesis (Biorad subcell GT, Hércules, EE.UU) a través de una matriz porosa con gel de agarosa al 1.8% en 80 mL de disolución tamponada Tris pH 8.0. Las muestras fueron separadas a 90 V durante 35 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular

de 100 bp (Promega, Madison, Estados Unidos). Los geles fueron visualizados mediante transiluminación UV en un sistema de imagen molecular (Biorad GelDoc, Hércules, EE.UU). Se contrataron los servicios de la empresa Macrogen, Maryland, EE.UU para la secuenciación de los fragmentos de ADN aislados de las hojas de *H. laricifolium*.

Se utilizó la herramienta de búsqueda básica de alineación local, conocido por sus siglas en inglés como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar las secuencias obtenidas con otros especímenes de *H. laricifolium* existentes en la base de datos GenBank del servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, conocido por sus siglas en inglés como NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se ingresó cada una de las secuencias de consulta al algoritmo BLAST, el cual mediante métodos estadísticos las compara con una base de datos de secuencias (secuencias sujetas) y regresa aquellas secuencias que tienen un nivel significativo de similitud con la secuencia de consulta (Madden, 2012).

Tabla 2. Características de secuencias de cebadores utilizados.

Código de barras	Nombre de cebadores	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño medio del marcador (pb)	Referencia
ITS	5a fwd 4 rev	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG TCCTCCGCTTATTGATATGC	707 (571-1153)	(Kress, Wurdack, Zimmer, Weigt, & Janzen, 2005)
ITS2	S ₂ F S ₃ R	ATGCGATACTTGGTGTGAAT GACGCTTCTCCAGACTACAAT	226 (163-311)	(Chen et al., 2010)

2.7 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)

2.7.1 Condiciones de operación y procedimiento de EFS

Se pesaron 2.5 g de muestra triturada en una balanza de precisión (Metler Toled, Columbus, EE.UU) y se colocaron en los cartuchos de extracción. Se utilizaron como elementos extractores dióxido de carbono (CO₂) y etanol como co-solvente en una proporción 90:10 (v/v). El contenido del co-solvente se fijó de acuerdo a datos de literatura para las propiedades críticas de estas mezclas binarias (Abdulagatov, Stepanov, & Abdulagatov, 2007). Además, se conoce que la adición de un componente polar es empleado a menudo como modificador para el CO₂ supercrítico en extracciones con el propósito de aumentar su eficiencia (Hawthorne, 1990). Las condiciones de temperatura y presión fueron fijadas en 40°C y 100 bares respectivamente. Finalmente, se estableció la velocidad de flujo de disolvente en 5 ml/min.

2.7.2 Preparación de extractos

Los extractos fueron concentrados en un rotavapor (Heidolph, Schwabach, Alemania) a una temperatura de 40°C. Se utilizó un baño de ultrasonido (Cole Parmer, Vernon Hills, EE.UU) para redissolver el extracto seco con una mezcla de cloroformo/etanol en una proporción 50:50 (v/v). El extracto redissuelto fue concentrado mediante una corriente de N₂ gaseoso hasta obtener una cantidad de 1 ml de concentrado y se dividió en viales para remover el total de solvente mediante un concentrador de presión reducida (Labconco Rapid Vap, Kansas City, EE.UU). Las condiciones de presión, velocidad y temperatura del concentrador se fijaron en 493 mbar, 12 rpm y 35°C respectivamente. Finalmente los viales con el extracto seco fueron conservados a -20°C hasta su análisis.

2.8 Determinación de la Concentración inhibitoria media (CI50)

Para evaluar la CI50 los extractos fueron disueltos en DMSO y sometidos a baño de ultrasonido por 1 hora. Se utilizó la cepa bacteriana SAMR ATCC ba44 para el screening de la actividad antibacteriana. El Cryo-stock de SAMR de concentración 5×10^5 CFU/ml fue mantenido a -80°C en caldo de tripticasa soya con 10% de glicerol. La concentración del inóculo utilizado en el screening fue de 5×10^3 CFU/ml.

El potencial antibacteriano de los extractos de *H. laricifolium* fue analizado mediante una modificación de la técnica de micro-dilución (Eloff, 1998). Se probaron concentraciones decrecientes (64, 16, 4, 1 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$) de todos los extractos en placas de 96 pocillos. El medio de cultivo utilizado fue caldo de tripticasa soya. Las placas de microtitulación con los inóculos bacterianos se incubaron a 35°C durante 24 horas. El proceso se controló mediante diluciones seriadas de ciprofloxacina (0.125 a 16 $\mu\text{g/ml}$). Además, se incluyó un control positivo (viabilidad de la bacteria) y un control negativo (esterilidad del medio) para cada screening. Tras el proceso de incubación, las placas de microtitulación se trataron con un lector de microplacas ELISA (Bio tek instruments, Winooski, Estados Unidos) a una longitud de onda de 405 nm. Se calculó los valores CI50 de los extractos a partir de las lecturas de inhibición a diferentes concentraciones. Por último, una alícuota de 100 μl de los pocillos que mostraron un crecimiento de inhibición mayor del 90% fue inoculada en agar tripticasa soya e incubados a 35.5°C durante 24 horas para evaluar ya sea la actividad bacteriostática o bactericida de los extractos. Los extractos que inhibieron el crecimiento de la bacteria después de 72 horas de incubación se reportaron como bactericidas.

2.9 Optimización de las condiciones cromatográficas

2.9.1 Preparación de extractos

A partir de 5 mg de extractos secos se prepararon muestras de 500 $\mu\text{g/ml}$ para el análisis HPLC. Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de membrana de PVDF de 0.45 μm previo a la inyección cromatográfica.

2.9.2 Establecimiento de la variable respuesta y factores

En el estudio de perfiles cromatográficos, más información puede ser obtenida cuando se observan más picos en el cromatograma, por lo que el número de picos se fijó como variable respuesta. Además, se identificaron 3 factores: temperatura de la columna, tipo de ácido y tipo de gradiente como variables explicativas. Para cada factor se eligió una amplia gama de condiciones experimentales mediante revisión bibliográfica. La temperatura de la columna es conocida como un parámetro importante por su influencia en la retención, selectividad, presión del sistema y la estabilidad de la columna (Dolan, 2002). Por otra parte, bajo condiciones ácidas y altas temperaturas, los flavonoides contenidos en *H. laricifolium* podrían hidrolizarse a sus agliconas, (Van Beek, 2002), por ello se fijó un intervalo de $20\text{--}40^\circ\text{C}$ para construir el método de perfiles cromatográficos (Xie et al., 2006; Yang et al., 2011).

En cuanto a la longitud de onda de detección, se fijó un intervalo comprendido entre 200 a 360 nm para la detección de una mayor cantidad de analitos; por ejemplo, los flavonoides reportados en literatura (Ji, Xu, Hu, & Vander Heyden, 2005; Su et al., 2008). Además, se fijaron otros factores controlables como:

- Velocidad de flujo: 1 ml/min
- Volumen inyección: 10 μl

- Longitud de onda de detección: las muestras se analizaron a 254, 280 y 360 nm.

2.9.3 Condiciones de optimización

La elución se realizó con una fase móvil compuesta de una solución acuosa de ácido acético o ácido fosfórico al 0.1% (componente A) y acetonitrilo (componente B). Los ácidos del componente A fueron comparados en el proceso de optimización. Para la optimización de las condiciones cromatográficas se utilizó un diseño factorial de 3 factores y 2 niveles. Las especificaciones de este diseño se pueden ver en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificación de factores y el dominio experimental.

Factores	Dominio experimental	
	Nivel (-1)	Nivel (+1)
x ₁ : Tipo de ácido (%)	Ácido acético (0.1)	Ácido fosfórico (0.1)
x ₂ : Temperatura de columna (°C)	20	40
x ₃ : Tipo de ácido	Lineal	Mixto

Las especificaciones de los gradientes con cambios en la relación de volumen de acetonitrilo (fase móvil B) quedaron establecidos de la siguiente manera:

Gradiente mixto: 0-10 min, 2-5%; 10-20 min, 5-30%; 20-30 min, 30-50%; 30-35 min, 50-100%; 35-40 min, 100%; 40-45 min, 100-2%; 45-47 min, 2%.

Gradiente lineal: 0-10 min, 0-50%; 50-53 min, 50-100%; 53-58 min, 100%; 58-62 min, 100-0 %; 62-65 min, 0%.

El número de experimentos generado por el diseño factorial (2³) se realizó por triplicado, dando un total de 24 experimentos.

2.9.4 Optimización de gradiente

La optimización de gradiente se puede considerar como un punto de estrategia general para mejorar la separación en HPLC (Dolan et al., 1999; Horváth, 2013). En dicha optimización pueden ser considerados el tiempo, forma de gradiente y la composición inicial de la fase móvil (Vivó-Truyols, Torres-Lapasió, & García-Alvarez-Coque, 2003). Por lo tanto se procedió a optimizar las condiciones del gradiente mixto obtenido en el paso anterior. Se generaron 2 tipos de experimentos, modificando la concentración inicial del solvente orgánico y el tiempo de gradiente. La concentración final del solvente orgánico se fijó en el 30% para asegurar que cada soluto puede eluir en una sola corrida. Las especificaciones de los gradientes con cambios en la relación de volumen de acetonitrilo (fase móvil B) quedaron establecidos de la siguiente manera:

Experimento 1: 0-5 min, 30-40%; 5-25 min, 40-80%; 25-35 min, 80-90%; 35-40 min, 90%; 40-45 min, 90-100%; 45-50 min, 100%; 50-52 min, 100-30%; 52-65 min, 30%.

Experimento 2: 0-5 min, 25-35%; 5-25 min, 35-80%; 25-35 min, 80-87,5%; 35-40 min, 87,5%; 40-45 min, 87.5-100%; 45-50 min, 100%; 50-52 min, 100-30%; 52-65 min, 30%.

2.9.5 Pretratamiento de datos cromatográficos

Previo al análisis de PLS, el conjunto de datos fueron sometidos a un proceso de pretratamiento de datos conocido como centrado de columnas. Este pretratamiento de datos es a menudo el más utilizado para conjuntos de datos espectroscópicos, logrando disminuir el número de variables experimentales y por lo tanto mejorando los resultados del modelo de predicción. En la matriz X, con dimensión n×p, n es el número de observaciones (huellas digitales de *H. laricifolium*) y p las variables (los puntos de tiempo en los que se midieron las absorbancias). El centrado de columnas consistió en restar para

cada columna la media de la columna de los elementos individuales de esa columna, resultando en una media cero de las variables transformadas y eliminando así la necesidad de un término constante en el modelo de regresión (Frenich et al., 1995; Seasholtz & Kowalski, 1992). Los criterios de evaluación del modelo PLS fueron los parámetros R^2 y REMCP.

2.9.6 Correlación entre la actividad antibacteriana y los perfiles cromatográficos

Para la obtención del modelo predictivo que pueda relacionar la actividad antibacteriana y los cromatogramas de las muestras de *H. laricifolium* en estadio joven y adulto se utilizó el análisis de PLS. La regresión PLS es un método muy utilizado para encontrar las relaciones fundamentales entre las variables independientes (X) y las variables dependientes (Y) (Berrueta, Alonso-Salces, & Héberger, 2007). Es decir, cuando se especifica una variable dependiente para una regresión, la técnica PLS es más eficiente que la técnica PCA para la reducción de dimensiones debido a la naturaleza supervisada de su algoritmo (Maitra & Yan, 2008). Los resultados se evaluaron utilizando 3 matrices de datos: los cromatogramas a longitudes de onda de 254, 280 y 360 nm. Además del cálculo de R^2 , se obtuvo el valor de REMCP. Este valor indica la incertidumbre media que puede esperarse al predecir los valores de Y para las nuevas muestras expresadas en las mismas unidades que la variable Y (Camo, 1996). Finalmente, el modelo PLS fue validado por medio de validación cruzada (10-fold C-V). El método de la validación cruzada permitió obtener los valores de EMCP, por lo general, el resultado se presenta como un gráfico que muestra EMCP en función del número de componentes y se denomina curva EMCP. Al mismo tiempo se determinó el NCO para los modelos de predicción, al elegir estos se evita la superposición de datos al no reutilizar los mismos datos para ajustarse a un modelo y para estimar el error de predicción. De acuerdo a literatura se procedió a elegir el menor valor de EMCP para el menor número de componentes posibles (Osten, 1988).

3. Resultados y discusión

3.1 Identificación molecular de *Hypericum laricifolium*

Los resultados de las coincidencias de los genes nucleares ITS e ITS2 con la base de datos de Gen bank del NCBI se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencias que producen alineaciones significativas.

Descripción Gen (Procedencia de muestra)	Identidad ^a	Valor E ^b
ITS (Parque Aguarongo)	99%	0.0
(Vía Nabon-Loja)	98%	0.0
(Vía Biblián-Cañar)	99%	0.0
ITS2 (Parque Aguarongo)	98%	8e-167
(Vía Nabon-Loja)	99%	3e-171
(Vía Biblián-Cañar)	99%	0.0

^a Identidad: similitud porcentual entre la consulta y la secuencia sujeta, ^b Valor E: indica el grado de significancia de la coincidencia, cuanto más bajo es el valor E, más “significativo” es la coincidencia.

El gen de cloroplasto *rbcl* no reportó coincidencias para la especie *H. laricifolium*, pero sí para diferentes especies del género *Hypericum*, por ejemplo, la base de datos GenBank de NCBI reporta la coincidencia con la especie *H. quitense*, con identidad de 99%. Esto

significa que hasta ahora no se ha realizado un estudio de reconocimiento genético de *H. laricifolium* con el gen *rbcl*. En contraparte, los genes nucleares ITS e ITS2 en la mayoría de los casos correspondieron a las secuencias con la puntuación BLAST más alta, confirmando así que las muestras utilizadas en la identificación genética pertenecen a la especie *H. laricifolium*. Estos resultados coinciden con los reportados en trabajos previos y confirman que los genes rDNA-ITS y rDNA-ITS2 son eficientes para la identificación molecular de *H. laricifolium*. (Howard et al., 2009; Nürk, Scheriau, & Madriñán, 2013).

3.2 Determinación de la CI50

Los valores de CI50 obtenidos para los extractos de *H. laricifolium* son presentados en la tabla 5 mostrada a continuación.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos lipofílicos sobre SARM.

Estadio adulto	CI50 (µg/ml)	Estadio joven	CI50 (µg/ml)
T101A	2.1	T104B	1.2
T103A	5.6	T106B	1.3
T105A	5.9	T208B	2.4
T209A	1.6	T210B	1.4
T211A	1.5	T212B	1.7
T313A	1.6	T315B	1.4
T314A	1.3	T316B	7.4
T319A	2	T317B	2.6
T421A	3.1	T318B	4.4
T423A	7.1	T220B	1
T425A	2.7	T422B	10.3
T427A	10.9	T424B	3.4
T429A	1.7	T426B	2.3
T431A	2.5	T428B	7.3
T435A	2.1	T433B	12.7

Un extracto es considerado: muy activo si el valor de su CI50 es menor que 5 µg/ml; ligeramente activo, si los valores de CI50 están entre 5 a 30 µg/ml, e inactivo, cuando el valor de la CI50 es mayor a 30 µg/ml.

Todos los extractos lipofílicos de *H. laricifolium* mostraron actividad antibacteriana sobre SARM, 22 de los extractos presentaron una actividad antibacteriana muy activa sobre SARM. En un trabajo previo se reporta una actividad positiva de extractos de cloroformo de *H. laricifolium* sobre SARM con una CI50 de 28 µg/ml (Jerves-Andrade et al., 2014). Otro estudio reporta un valor de CMI de 160 µg/ml para extractos etanólicos de *H. laricifolium* sobre SARM (Bussmann et al., 2010). Los mejores resultados alcanzados en este trabajo en comparación con los citados puede deberse al uso de extracción por fluidos supercríticos modificado (CO₂ supercrítico más un solvente polar) que producen extractos con un efecto antibacteriano más consistente que los extractos obtenidos con solventes orgánicos debido a su mayor poder de extracción de compuestos polares como la hiperforina (Cossuta et al., 2012; Lang & Wai, 2001; Reverchon & De Marco, 2006). Finalmente, el análisis de la prueba T de Student no evidenció una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de CI50 en los estadios joven y adulto de *H. laricifolium*.

3.3 Optimización de las condiciones cromatográficas

El análisis ANOVA reveló una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los experimentos realizados y mediante la prueba estadística de Tukey se determinó que el experimento 6 difiere de los demás de manera significativa, mostrando así al método 6 como el de mayor número de picos. En cuanto a la optimización del gradiente, las condiciones del experimento 2 mostraron una mejor separación de los picos cromatográficos. Por lo tanto, las condiciones de este gradiente mixto, temperatura de la columna de 40°C y solución acuosa de ácido fosfórico al 0,1% (componente A de la fase móvil) quedaron establecidos como condiciones optimizadas para obtener los cromatogramas de los extractos de *H. laricifolium*. Los cromatogramas optimizados se muestran a continuación en la Figura 1.

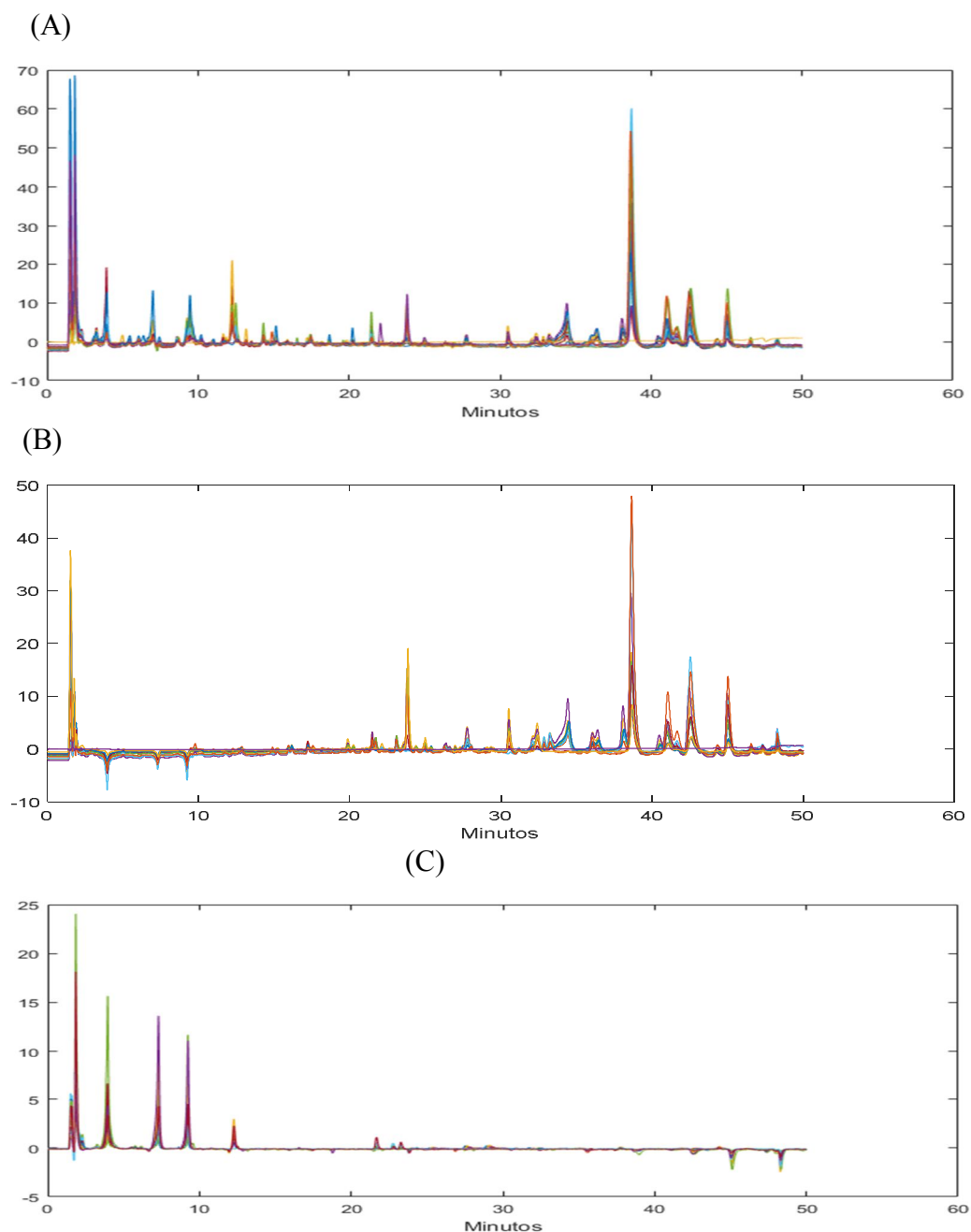


Figura 1. Cromatogramas optimizados de muestras de *H. laricifolium* en tres longitudes de onda diferentes. (A) 254 nm, (B) 280 nm, y (C) 360 nm.

3.4 Obtención del modelo predictivo

En la tabla 6 se indican los resultados para los tres modelos predictivos considerando el NCO, valores de R^2 , y el error de predicción REMCP. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el perfil cromatográfico con longitud de onda de 254nm.

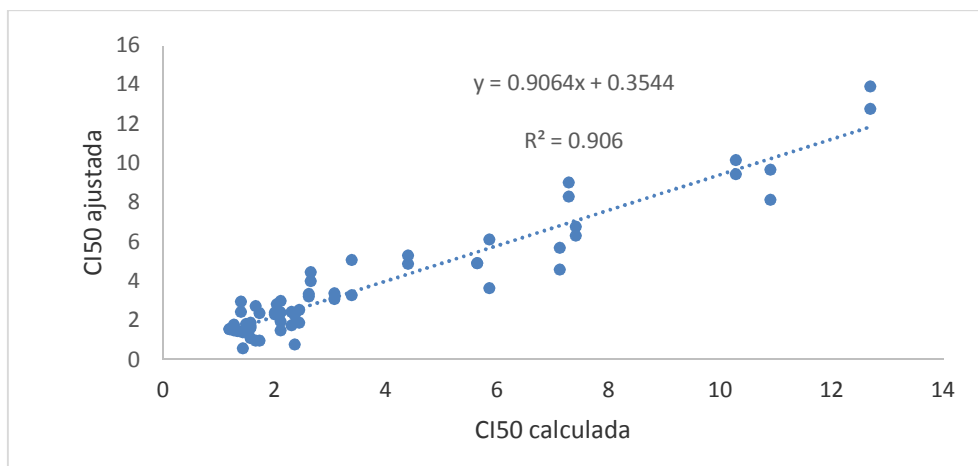
Tabla 6. Resultados comparativos de los modelos de predicción PLS.

Modelo	NCO ^a	R^2 ^b	REMCP ^c
Cromatograma de 254 nm	8	0.9064	2.25
Cromatograma de 280 nm	8	0.8471	2.45
Cromatogramas de 360 nm	8	0.8685	2.55

^a NCO: número de componentes óptimos; ^b R^2 : coeficiente de correlación; ^c REMCP: raíz de error medio cuadrático de prediction.

Los gráficos de las correlaciones entre los valores de actividad antioxidante experimental y ajustada para todas los diferentes modelos de predicción se muestran en la Figura 2.

(A)



(B)

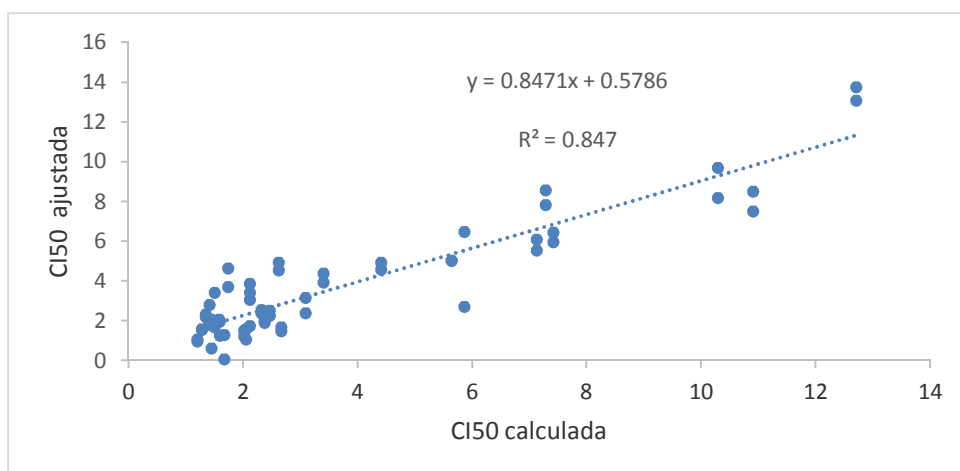


Figura 2. Correlación entre la actividad antibacteriana experimental y ajustada para las muestras utilizadas para los perfiles cromatográficos de 254 nm (A) y 280 nm (B).

Cuando se construye un modelo PLS la detección de posibles valores atípicos y el grado de influencia de estos son un aspecto muy importante a considerar (Van Nederkassel, Daszykowski, Massart, & Vander Heyden, 2005). Estos valores atípicos presentes en un modelo pueden reducir de manera significativa la confiabilidad del modelo (Pell, 2000). En el presente trabajo una muestra fue considerada como un valor atípico. La muestra considerada como un valor atípico fue una muestra de *H. laricifolium* codificada como T433B con una CI50 de 12.7 µg/ml. Sin embargo, al construir el modelo para el cromatograma de 254 nm excluyendo este valor atípico no se obtuvo una mejora de la capacidad predictiva del modelo ($R^2 = 0.87$, REMCP = 2.3). Por lo tanto, esta muestra de *H. laricifolium* fue considerada en la construcción del modelo de PLS.

4. Conclusión

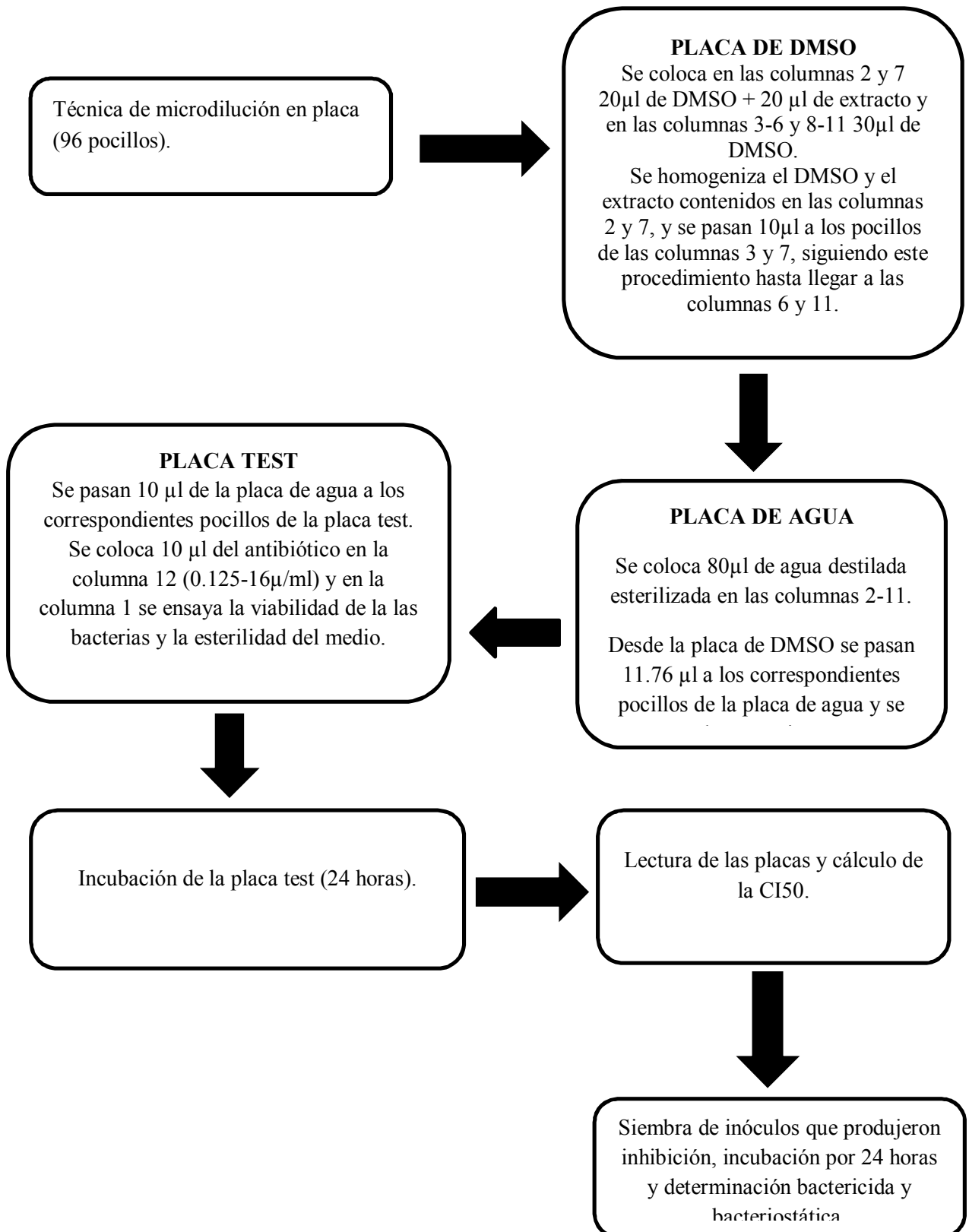
El objetivo de este trabajo fue establecer una relación entre la actividad antibacteriana y las etapas de desarrollo de *H. laricifolium* a partir de los perfiles cromatográficos de esta especie *Hypericum*. La identidad de *H. laricifolium* fue confirmada mediante la técnica molecular código de barras genético basado en los genes nucleares ITS e ITS2. Debido al proceso de optimización realizado en este trabajo se obtuvieron una buena calidad de separación de los perfiles cromatográficos. Se demostró que después de un preprocesamiento apropiado de los cromatogramas (centrado de columnas) se pudo construir un modelo de PLS confiable para predecir la capacidad antibacteriana de extractos de *H. laricifolium* independientemente de la etapa de desarrollo. En cuanto a la actividad antibacteriana, la prueba T de Student no reveló ninguna diferencia significativa entre las CI50 de los estadios joven y adulto de *H. laricifolium*. Esta estrategia llevada a cabo en este trabajo para relacionar una actividad biológica y una variable natural mediante su perfil cromatográfico no solo puede utilizarse para extractos de *H. laricifolium* sino también para otras hierbas medicinales para identificar y evaluar la influencia de las variables naturales sobre una determinada actividad biológica.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la red Vlr Network Ecuador por su ayuda brindada en la disposición de laboratorios y equipos. Un agradecimiento especial a los técnicos de dicha institución.

ANEXOS

ANEXO 1: PROCEDIMIENTO DE LA TECNICA DE MICRODILUCION EN PLACA



ANEXO 2: EXTRACCION DE ADN MEDIANTE EL METODO CTAB

Preparación del buffer de extracción:

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial (800 µl)	Volumen (4.8ml)
CTAB	7%	2.8%	320	1.92
NaCl	5M	1.3M	208	1.24
EDTA (pH 8.0)	0.5M	20mM	32	0.19
Tris-HCL (pH 8.0)	1M	100mM	80	0.48
PVP (40000)	---	1%	8	0.048
B-mercapto ethanol	---	0.2%	1.6	0.0096
ddH2O	---	Completar a 800 µl	150.4	0.90

Volumen final= 800 µl

$$Volumen\ inicial\ (\mu l) = \frac{(concentración\ final)(volumen\ final)}{concentración\ inicial}$$

1. Preparar 800 µl por muestra a extraer de la solución descrita anteriormente (manteniendo las concentraciones y descripciones iniciales).
2. En 120 mg de tejido triturado adicionar 800 µl del buffer de extracción a cada muestra y mezclar en vortex.
3. Adicionar 15 µl de proteinasa K (20 µg/µl) y colocar a baño María (65°C) durante una hora, invirtiendo los tubos cada 10 minutos.
4. Retirar los tubos del baño María y dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Adicionar 700 µl de cloroformo-isoamil (24:1) y agitar por inversión los tubos hasta observar turbiedad.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm/4°C, retirar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo de 2 ml.
7. Adicionar 6 µl RNase (40 µg/ml) e incubar por 15 minutos a 37°C.
8. Adicionar 1 volumen de cloroformo-isoamil (24:1) y agitar por inversión.
9. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm/4°C, retirar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo de 1.5ml.
10. Adicionar 1 volumen de isopropanol frío, mezclar invirtiendo el tubo por 5 minutos, colocar las muestras en 20°C durante 30 minutos (o quedarse toda la noche a 4°C).
11. Centrifugar por 20 minutos a 14000 rpm/4°C, remover el sobrenadante y lavar 2 veces el pellet con 200 µl de etanol al 70% y volver a centrifugar en las mismas condiciones pasadas.
12. Secar a temperatura ambiente de 15-20 minutos o alternativamente usar el Vacufuge.
13. Resuspender el ADN en 100 o 50 µl (dependiendo de la concentración esperada) de agua ultra pura.

Opcional:

Purificar el ADN con el kit de purificación marca Promega.

Referencias

- Abdulagatov, A., Stepanov, G. V., & Abdulagatov, I. m. M. (2007). The critical properties of binary mixtures containing carbon dioxide: Experimental data. *High Temperature*, 45(1), 85-126.
- Abreu, I. N., Porto, A. L. M., Marsaioli, A. J., & Mazzafera, P. (2004). Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, 167(4), 949-954. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.002
- Aguilar, Z., Ulloa, C., & Hidalgo, P. (2009). Guia de plantas útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador. Proyecto de manejo y aprovechamiento sustentable de alpacas en los Páramos de Zuleta. PPA-EcoCiencia, Quito. 05 December 2014. In.
- Andersson, F. O., Kaiser, R., & Jacobsson, S. P. (2004). Data preprocessing by wavelets and genetic algorithms for enhanced multivariate analysis of LC peptide mapping. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 34(3), 531-541.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Peñaherrera, E., Orellana, A., Tobar, V., & De Witte, P. (2010). Estudio preliminar sobre plantas medicinales utilizadas en algunas comunidades de las provincias de Azuay, Cañar y Loja, para afecciones del aparato gastrointestinal. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of chromatography A*, 1158(1), 196-214.
- Bussmann, R. W., Ashley, G., Sharon, D., Chait, G., Diaz, D., Pourmand, K., . . . Aguirre, C. (2011). Proving that traditional knowledge works: the antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. *Ethnobotany Research and Applications*, 9, 067-096.
- Bussmann, R. W., Malca-Garcia, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Diaz, D., . . . Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol*, 132(1), 101-108. doi:10.1016/j.jep.2010.07.048
- Camo, A. (1996). The Unscrambler 6. User's guide. *Computer-Aided Modelling A/S, Trondheim, Norway*.
- Ccana-Ccapatinta, G. V., & von Poser, G. L. (2015). Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum laricifolium* Juss. *Phytochemistry Letters*, 12, 63-68.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., . . . Pang, X. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1), e8613.
- Christensen, J. H., Tomasi, G., & Hansen, A. B. (2005). Chemical fingerprinting of petroleum biomarkers using time warping and PCA. *Environmental science & technology*, 39(1), 255-260.
- Cossuta, D., Vatai, T., Báthori, M., Hohmann, J., Keve, T., & Simándi, B. (2012). Extraction of hyperforin and hypericin from st. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) with different solvents. *Journal of Food Process Engineering*, 35(2), 222-235.
- Crockett, S., Eberhardt, M., Kunert, O., & Schühly, W. (2010). *Hypericum* species in the Páramos of Central and South America: a special focus upon *H. irazuense* Kuntze ex N. Robson. *Phytochemistry reviews*, 9(2), 255-269.
- Daszykowski, M., Wu, W., Nicholls, A., Ball, R., Czekaj, T., & Walczak, B. (2007). Identifying potential biomarkers in LC-MS data. *Journal of Chemometrics*, 21(7-9), 292-302.
- Dolan, J., Snyder, L., Wolcott, R., Haber, P., Baczek, T., Kaliszan, R., & Sander, L. (1999). Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples

- by optimizing temperature and gradient time: III. Improving the accuracy of computer simulation. *Journal of Chromatography A*, 857(1), 41-68.
- Dolan, J. W. (2002). Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 965(1), 195-205.
- Eloff, J. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica*, 64(08), 711-713.
- Gibbons, S., Ohlendorf, B., & Johnsen, I. (2002). The genus *Hypericum*-a valuable resource of anti-staphylococcal leads. *Fitoterapia*, 73(4), 300-304.
- Gong, F., Wang, B. T., Chau, F. T., & Liang, Y. Z. (2005). Data preprocessing for chromatographic fingerprint of herbal medicine with chemometric approaches. *Analytical letters*, 38(14), 2475-2492.
- Guillén Mena, P. O., & Sarmiento Berrezueta, G. I. (2011). Validación de las metodías aplicadas a los procesos de selección, lavado, secado y almacenamiento para plantas medicinales a través de aplicación de técnicas oficiales basadas en la farmacopea de la Organización Mundial de la Salud.
- Hawthorne, S. B. (1990). Analytical-scale supercritical fluid extraction. *Analytical Chemistry*, 62(11), 633A-642A.
- Horváth, C. (2013). *High-performance liquid chromatography: advances and perspectives*: Elsevier.
- Howard, C., Bremner, P. D., Fowler, M. R., Isodo, B., Scott, N. W., & Slater, A. (2009). Molecular identification of *Hypericum perforatum* by PCR amplification of the ITS and 5.8 S rDNA region. *Planta medica*, 75(08), 864-869.
- Jerves-Andrade, L., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., Maes, L., & Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in south Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(45), 1310-1320.
- Ji, Y.-B., Xu, Q.-S., Hu, Y.-Z., & Vander Heyden, Y. (2005). Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1066(1), 97-104.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369-8374.
- Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
- Madden, T. (2012). Chapter 16. The BLAST Sequence Analysis Tool. The NCBI Handbook; 2002. In.
- Maitra, S., & Yan, J. (2008). Principle component analysis and partial least squares: Two dimension reduction techniques for regression. *Applying multivariate statistical models*, 79, 79-90.
- Nürk, N. M., Scheriau, C., & Madriñán, S. (2013). Explosive radiation in high Andean *Hypericum*-rates of diversification among New World lineages. *Frontiers in genetics*, 4, 175.
- Organization, W. H. (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants
- Osten, D. W. (1988). Selection of optimal regression models via cross-validation. *Journal of Chemometrics*, 2(1), 39-48.
- Pell, R. J. (2000). Multiple outlier detection for multivariate calibration using robust statistical techniques. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 52(1), 87-104.

- Querci, M., Jermini, M., & Eede, G. (2006). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. *Training course on*, 33.
- Ragunathan, A., & Ravi, L. (2015). Potential antibacterial drug targets for Quercetin and Rutin: An in silico study using AutoDock.
- Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.
- Roberto, H. S., Collado, C., & Lucio, P. B. (2010). Metodología de la investigación. 5a. edición. Ed. In: Mc. Graw Hill Interamericana. México.
- Robson, N. (1990). Studies in the genus *Hypericum* L.(Guttiferae) 8. Section 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bulletin of the British Museum (Botany)*, 20.
- Saddique, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of ethnopharmacology*, 131(3), 511-521.
- Su, J., Fu, P., Shen, Y., Zhang, C., Liang, M., Liu, R., . . . Zhang, W. (2008). Simultaneous analysis of flavonoids from *Hypericum japonicum* Thunb. ex Murray (Hypericaceae) by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(2), 342-348.
- Tistaert, C., Dejaegher, B., & Heyden, Y. V. (2011). Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Analytica Chimica Acta*, 690(2), 148-161. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.023
- Van Beek, T. A. (2002). Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *Journal of Chromatography A*, 967(1), 21-55.
- Van Nederkassel, A., Daszykowski, M., Massart, D., & Vander Heyden, Y. (2005). Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modeling. *Journal of Chromatography A*, 1096(1), 177-186.
- Vivó-Truyols, G., Torres-Lapasió, J., & Garcia-Alvarez-Coque, M. (2003). Error analysis and performance of different retention models in the transference of data from/to isocratic/gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 1018(2), 169-181.
- Xie, P., Chen, S., Liang, Y.-z., Wang, X., Tian, R., & Upton, R. (2006). Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of chromatography A*, 1112(1), 171-180.
- Yang, D.-Z., An, Y.-Q., Jiang, X.-L., Tang, D.-Q., Gao, Y.-Y., Zhao, H.-T., & Wu, X.-W. (2011). Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation. *Talanta*, 85(2), 885-890.
- Çirak, C., Radusiene, J., Ivanauskas, L., Jakstas, V., & Çamaş, N. (2014). Phenological changes in the chemical content of wild and greenhouse-grown *Hypericum pruinatum*: flavonoids. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(3), 362-370.
- Çirak, C., Radusiene, J., Kapraviciene, B., Çamaş, N., & Odabaş, M. S. (2013). Changes in phenolic content of wild and greenhouse-grown *Hypericum triquetrifolium* during plant development. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(3), 307-314.
- Çirak, C., Radušienė, J., Ivanauskas, L., & Janulis, V. (2007). Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum organifolium* during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 197-203. doi:10.1007/s11738-007-0024-7